

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotnická technika



Ivan Vyletěl

Kvantitativní srovnání pericytárního pokryvu placentárních kapilár zdravých matek a diabetiček

Quantitative comparison of pericytal coverage of placental capillaries of diabetic and nondiabetic mothers

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Marie Jirkovská CSc.

Datum obhájení práce:

Praha 2010



Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.


Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

~~Souhlasím – Nesouhlasím*~~

V Praze, 10. 05. 2010

Ivan Vyletěl

Podpis:



* **Nehodící se škrtnete**

Identifikační záznam

VYLETĚL, Ivan. *Kvantitativní srovnání pericytárního pokryvu placentárních kapilár zdravých matek a diabetiček*. Praha, 2010. 31 s. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je příspěvkem k výzkumu struktury placentárních kapilár. Zabývá se kvantitativním srovnáním pokryvu pericytů, které obepínají kapilární endotel.

Vzorky byly odebrány z 8 placent zdravých matek a 18 placent matek, jejichž těhotenství bylo komplikováno 1. typem diabetu.

Marker pericytů hladkosvalový aktin, byl prokázán imunohistochemicky na parafinových řezech. Snímky placentárních terminálních klků byly získány konfokálním mikroskopem a konvertovány do datového formátu TIFF. Měření podílu pericytárního pokryvu na průřezu kapilárou bylo uskutečněno pomocí softwaru ImageJ.

Získané hodnoty byly statisticky zpracovány a z výsledků a odhalení slepého testu byly učiněny závěry.

Test nepotvrdil hypotézu, že diabetes mellitus 1. typu má vliv na hustotu pericytárního pokryvu kapilární stěny v placentě.

Abstract

This bachelor thesis is a contribution to the research of structure of the placental capillaries. It deals with a quantitative comparison of pericytal coverage which encloses the endothelium of capillaries.

Samples were substracted from the placentas of 8 healthy mothers and from 18 placentas of mothers whose pregnancies were complicated by Type 1 diabetes mellitus.

The marker of pericytes actin was demonstrated by immunohistochemistry on histological sections of formaline-fixed and paraffin-embedded specimens. Images of the placental terminal villi were obtained by confocal microscope and converted into TIFF data format. Measurements of the extent of pericytal coverage on the cross-section of a capillary were realized using ImageJ software.

The obtained data were statistically analyzed and the conclusions were drawn from the results and revelation of a blind test.

The test did not confirm the hypothesis that the diabetes mellitus type I affects the density of pericytal coverage of the capillary walls in the placenta.

Klíčová slova:

pericyt, kapilára, placenta, hladkosvalový aktin, ImageJ

Key words:

pericyte, capillary, placenta, smooth muscle actin, Image J

Poděkování

Rád bych tímto velmi poděkoval své konzultantce MUDr. Marii Jirkovské CSc. za velkou pomoc, ochotu a rady při odborném vedení práce. Mé poděkování dále patří MUDr. Tomáši Kučerovi Ph.D. za pomoc se sběrem dat a poskytnutí literatury. V neposlední řadě děkuji RNDr. Janu Klaschkovi Ph.D. za vyjádření ke statistickému obsahu a Mgr. Jitce Krajičkové za pomoc při sestavení formálních náležitostí mé práce.

Obsah

1. Cíl práce.....	8
2. Úvod	9
2.1 Stavba kapilár	9
2.2 Význam pericytů	11
3. Materiál.....	14
3.1 Odběr materiálu	14
3.2 Příprava materiálu	14
4. Metody.....	15
4.1 Program ImageJ – popis programu.....	15
4.2 Postup měření	16
4.3 Statistické vyhodnocení.....	18
5. Výsledky.....	19
6. Diskuze	26
7. Závěr.....	29
8. Literatura	30

1. Cíl práce

Placenta je přechodně existující orgán, který kromě jiných funkcí slouží jako styčná plocha i bariéra mezi matkou a plodem, jejímž úkolem je selektivní výměna látek. Důležitou složkou této bariéry je kapilární stěna. Kvalita stěny, tvořené endotelem a pericyty, je pro látkovou výměnu určující.

Kvantitativními rozdíly pericytárního pokryvu kapilár v placentách matek, které své těhotenství strávily ve vysokých nadmořských výškách, a matek, které během těhotenství žily v nízkých nadmořských výškách, se zabývala práce autorů Zhanga a spolupracovníků (Zhang et al., 2002). Výsledky ukázaly, že v placentách matek z vyšších nadmořských výšek, kde je plod vzhledem k nízkému parciálnímu tlaku kyslíku ohrožen hypoxií, je pericytární pokryv řidší.

Plody matek, jejichž těhotenství je komplikováno diabetickou poruchou, jsou hypoxií ohroženy rovněž. Proto se tato práce zabývala otázkou, zda dochází ke strukturálním změnám – úbytku hustoty pericytárního pokryvu také v placentárních kapilárách diabetiček.

Tato práce vznikla na Ústavu pro histologii a embryologii 1. LF UK v Praze jako součást řešení grantu GA ČR číslo 304/09/0733.

2. Úvod

Kapiláry jsou drobné cévy, které tvoří spojnice mezi terminálními arterioly a postkapilárními venulami cévního řečiště. Přejít mezi terminální arterioly a kapilárou je pak ohraničený uspořádáním několika hladkých svalových buněk, tzv. prekapilárním svěračem. Kontrakcemi a následnými dilatacemi těchto svalových buněk se reguluje průtok krve kapilárním řečištěm. Průměr kapilár se pohybuje obvykle kolem 7 μm , přičemž síla jejich stěny činí přibližně 1 μm . Ovšem v některých orgánech (endokrinní žlázy, placenta) dosahuje průměr kapilár hodnot daleko vyšších.

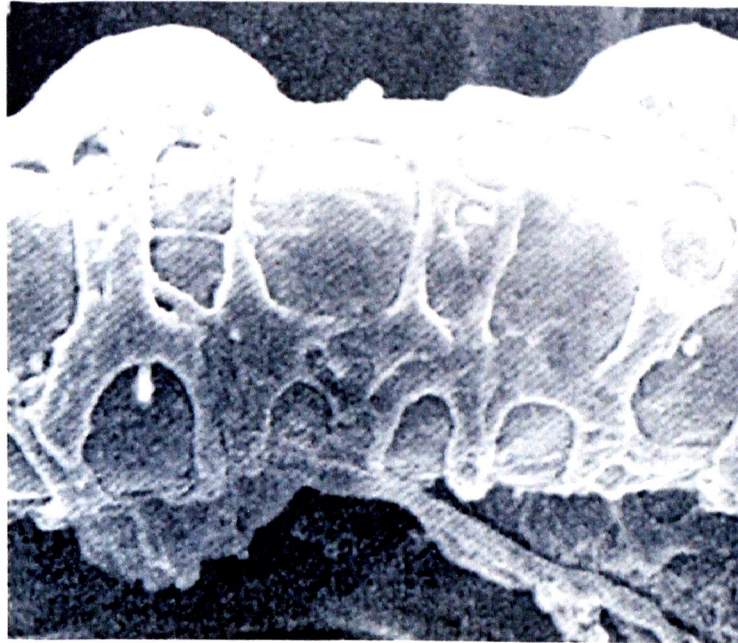
2.1 Stavba kapilár

Na stavbě kapilární stěny se podílejí dva druhy buněk, endotel a pericyty (Junqueira et al., 1997; Young & Heath, 2000; Gartner & Hiatt, 2001). Endotelová výstelka kapiláry je tvořena plochými buňkami, které jsou protáhlé ve směru toku krve a spočívají na souvislé lamina basalis. Na její abuminální povrch přiléhají kromě jemných kolagenních a retikulárních fibril i buňky s dlouhými a větvenými cytoplazmatickými výběžky, které obepínají endotelovou trubici, pericyty (obr. 1). Jeden pericyt neúplně překrývá několik buněk endotelových, naopak mezi sebou se pericyty svými výběžky dotýkají jen vzácně a dosud nebyl popsán případ speciálního mezibuněčného spojení mezi dvěma pericyty. Tyto původem mezenchymové buňky mají tedy velmi těsný vztah s buňkami endotelu a jsou kryty laminou basalis, na jejímž vytváření mají svůj podíl. U pericytů byla prokázána přítomnost aktinu, myosinu a tropomyosinu, což vede k názoru, že pericyty mají kontraktilní schopnost, jíž se podílejí na stabilizaci tonu kapilární stěny. Spolu s endotelem a lamina basalis se podílejí na vytváření semipermeabilní bariéry pro molekulární metabolity a migrující buňky. Vytváření složek lamina basalis, fagocytóza a hraní důležitou roli při angiogenezi jsou dalšími funkcemi pericytů (Díaz - Flores, 2009).

Funkčně představuje kapilární stěna styčnou plochu mezi krví a tkáněmi organismu, v případě placenty slouží jako mediátor pro přenos látek mezi matkou a plodem (Elišková & Naňka, 2006).

Krevní kapiláry lze podle stavby stěny rozdělit na kapiláry se souvislou endotelovou výstelkou, fenestrované kapiláry, kapiláry s póry a kapiláry sinusoidní.

- a) Kapiláry se souvislou endotelovou výstelkou, též známé jako somatické kapiláry, se vyznačují obvykle nejmenším průměrem. Mají podobu jednoduchých trubic vystlaných hladkým endotelem, který je souvislý. Plošný rozměr buněk endotelu je značně velký a obvykle stačí 1-2 buňky k vystlání příčného průměru kapiláry. Přibližně uprostřed endotelové buňky je uloženo jádro, které se vyklenuje do lumina cévy. Kapiláry se ve svém průběhu mnohonásobně větví a v orgánech vytvářejí složité sítě v závislosti na aktivitě daného orgánu. Somatické kapiláry se vyskytují např. v hladkém i příčně pruhovaném svalstvu, mozku a dalších tkáních.
- b) Kapiláry fenestrované, neboli kapiláry viscerálního typu, jsou vystlány endotelovými buňkami, které mají v tenké vrstvě cytoplazmy vytvořeny fenestrace. Tato „okna“, otvory o šíři 60 – 80 nm v průměru jsou přepažené diafragmou. Endotel je obklopen kontinuální lamina basalis. Kapiláry tohoto typu se vyskytují v orgánech, v nichž dochází k rychlé výměně látek mezi buňkami a krví, např. ve střevních klících a ve žlázách s vnitřní sekrecí.
- c) Kapiláry s póry jsou vystlány endotelovými buňkami, které mají ve své cytoplazmě vytvořené otvory, avšak bez diafragmy. Lamina basalis je nepřerušena. Tyto kapiláry se vyskytují např. v glomerulech ledvin.
- d) Kapiláry sinusoidní jsou charakteristické svým nepravidelným lumenem, jehož průměr kolísá mezi 8 a 40 μm v průběhu délky téže jedné kapiláry. Mezi endotelovými buňkami jsou patrné široké mezibuněčné štěrby, v cytoplazmě četné fenestrace a póry. Lamina basalis není souvislá a pojivový obal tvoří pouze síť retikulárních vláken. Některé z endotelových buněk mají schopnost fagocytózy. Kapiláry, které se vyskytují např. ve slezině, játrech a kostní dřeni, jsou sinusoidního typu.



Obr. 1: Pericyty na povrchu kapiláry znázorněné řádkovacím elektronovým mikroskopem

2.2 Význam pericytů

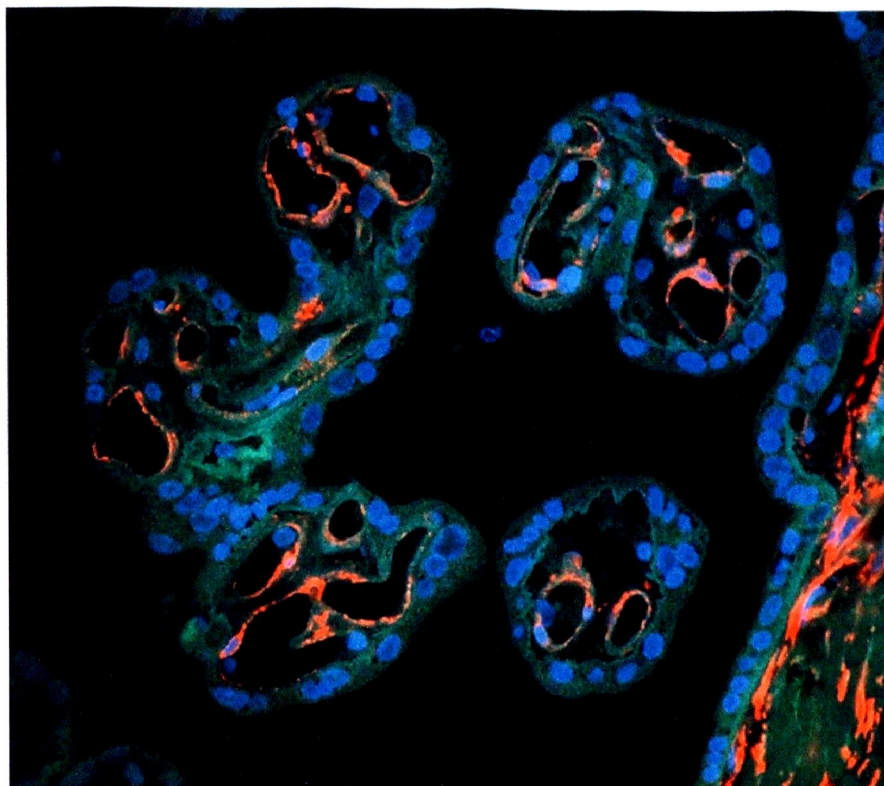
Samotná přítomnost a hustota pericytárního povrchu hraje významnou úlohu v plasticitě kapilárního řečiště a endotelové buňky bez pericytárního pokryvu jsou výrazněji ovlivněny růstovými faktory, které přicházejí krevní cestou.

Naproti tomu, pokud jsou mladé cévy rohovky, které jsou charakteristické absencí pericytárního pokryvu, vystaveny podmínkám v prostředí s vysokým parciálním tlakem kyslíku, dojde k jejich regresi. Odtud plyne hypotéza, že interakce mezi pericytem a endotelovou buňkou se liší v závislosti na množství kyslíku v prostředí, ve kterém jedinec žije, a od nich se odvíjí přizpůsobení samotné kapiláry.

Kromě strukturální funkce plní pericytární pokryv i úlohu podpůrné selektivní vrstvy, jak je tomu např. u hematoencefalické bariéry, kterou spoluvytváří. Pericytární buňky zabraňují spolu s dalšími buňkami nežádoucím proteinovým makromolekulám v prostupu přes bariéru do šedé hmoty mozkové. Významem pericytárního pokryvu a jeho kvantitativním měřením se zabývají i studie zaměřené na angiogenezi cévních řečišť v nádorech (Eberhard et al., 2000).

V lidské placentě mají kapiláry stěnu somatického typu, jejich průměr je ale velmi variabilní (Benirschke & Kaufmann, 1995; Jirkovská et al., 2008). Podobně jako v jiných lokalizacích, je souvislá endotelová kapilární výstelka na abluminálním povrchu pokryta

plochými pericyty, jejichž těla a výběžky jsou zavzaty do lamina basalis. Pouze v oblasti jádra je pericyt silnější a připomíná prsten s kamenem (jádrem) nasazený kolem cévy. Pro kapiláry v placentě je typické, že tam, kde stěna kapiláry spolu se syncytiotrofoblastem vytváří tzv. vaskulosyncytiální membránu, tj. místo preferenčního transportu, je velmi omezen výskyt pericytárních výběžků (obr. 2).



Obr. 2: Pericyty (červeně) ve stěně kapilár terminálních klků placenty

Kromě výše zmíněných funkcí se předpokládá, že pericyty mohou s buňkami endotelu úzce spolupracovat na vaskulogenezi v časném vývoji placenty a na angiogenezi v pozdější fázi těhotenství (Challier et al., 1999).

Je zřejmé, že hustota pericytárního pokryvu, tj. těl a výběžků pericytů, ovlivňuje transport přes stěnu kapiláry, což má přímý vliv na výměnu látek mezi matkou a plodem. O hustotě pericytárního pokryvu kapilár v placentě však dosud existuje pouze jedna práce (Zhang et al., 2002).

V této práci autoři studovali, jak je pericytární pokryv kapilár v terminálních klcích placenty ovlivněn nadmořskou výškou (a s ní souvisejícím parciálním tlakem kyslíku), ve které žena prožila dobu svého těhotenství. Zhang a spolupracovníci kategorizovali pozorované placentární kapiláry podle velikosti jejich vnitřního průměru, samotný

pericytární povrch však nekvantifikovali. Omezili se na rozdělení kapilár podle kritéria přítomnosti pericytárního pokryvu, k čemuž použili jako marker pozitivní průkaz hladkosvalového aktinu (SMA = smooth muscle actin) v těle a výběžcích pericytu.

Výsledky ukázaly, že v placentě matek, které své těhotenství strávily ve vysokých nadmořských výškách, byl průměr kapilár vyšší a jejich stěna byla pericyty méně často pokryta. Absence pericytů u přibližně poloviny placentárních kapilár matek žijících takto vysoko podle autorů znamená ztenčení bariéry, jež odděluje krevní oběh matky a plodu. Tím se usnadňuje látková výměna a transport kyslíku k plodu, který je v těchto podmínkách více ohrožen hypoxií.

Hypoxie však ohrožuje nejenom plody matek ve vysokohorských výškách, ale rovněž plody matek, jejichž těhotenství je komplikováno cukrovkou (Hájek et al., 2004). Abychom zjistili, zda na onemocnění diabetem reaguje placenta podobným způsobem jako na nízký obsah kyslíku v ovzduší, kvantifikovali jsme pericytární pokryv kapilár v terminálních klcích zdravých rodiček a matek trpících diabetes mellitus I. typu.

3. Materiál

3.1 Odběr materiálu

Odběry placentárních vzorků proběhly na porodních sálech Gynekologicko – porodnické kliniky 1. LF UK a VFN za informovaného souhlasu matek a za schválení příslušné etické komise.

Z každé z celkem 26 placent (8 kontrolních a 18 z těhotenství komplikovaných diabetes mellitus I. typu) bylo systematickým náhodným výběrem odebráno 21 tkáňových bločků, které byly dále zpracovány v laboratoři Ústavu pro histologii a embryologii.

3.2 Příprava materiálu

Vzorky byly fixovány 4% formaldehydem a zality do parafínu. Z každé placenty bylo opět náhodně vybráno 5 bločků. Z každého bločku byly nakrájeny řezy o síle 7 μm . Na jednom řezu z každého bločku byl proveden imunohistochemický průkaz markeru pericytů α SMA (smooth muscle actin).

Řezy byly deparafinovány a byla na nich provedena revitalizace antigenů povařením v citrátovém pufru (0,01 mol citrát sodný, pH 6,0) v mikrovlnné troubě. Nespecifické vazby epitopů byly blokovány 5% normálním kozím sérem v PBS pufru jednu hodinu při pokojové teplotě. Poté byly vzorky inkubovány s primární protilátkou (Rabbit anti – SMA (Abcam UK)). Jako sekundární protilátka bylo použito kozí antikráličí serum konjugované s fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 532. Jádra byla dobarvena barvivem DAPI. Řezy byly montovány do speciálního montovacího média pro imunofluorescenci Vectashield (Vector Laboratories, Inc.).

Obarvené řezy byly fotografovány pomocí konfokálního mikroskopu LEICA SPE imersním objektivem o zvětšení 40x, N.A. = 1,15. Budící jednofotonový laser měl vlnovou délku nastavenou na 532 nm pro snímání signálu buněčných struktur vizualizovaných barvivem Alexa Fluor 532, emisní spektrum bylo 535 až 750 nm. Pro barvivo DAPI byla budící vlnová délka 405 nm (obr. 2). Z každého řezu bylo pořízeno celkem 6 snímků zorných polí se vzájemným odstupem dvou zorných polí. Šum, který signál zkresloval, byl minimalizován zprůměrováním 4 pořízených skenů.

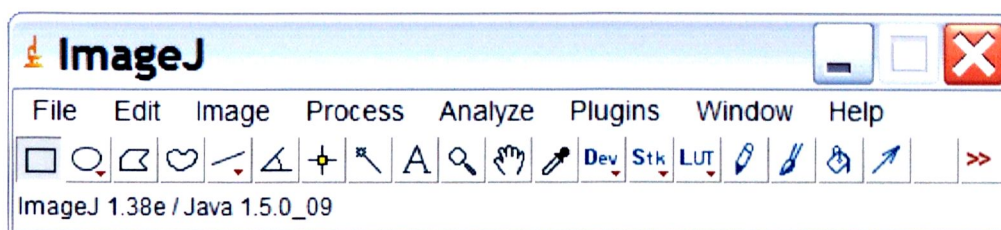
4. Metody

4.1 Program ImageJ – popis programu

Pro měření parametrů jsem použil program ImageJ.

ImageJ je volně šiřitelný grafický program k analýze obrazu vydaný NIH (National Institute of Health), složkou ministerstva zdravotnictví Spojených států amerických.

Program byl v konečné podobě vydán r. 1997. ImageJ dokáže operovat s řadou datových formátů, tedy je zobrazovat, upravovat, analyzovat či ukládat, zejména pak s formáty TIFF (Tagged Image File Format), JPEG nebo DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine), který se běžně používá pro přenos a ukládání lékařských obrazů, například z ultrazvuku nebo rentgenů (obr. 3).

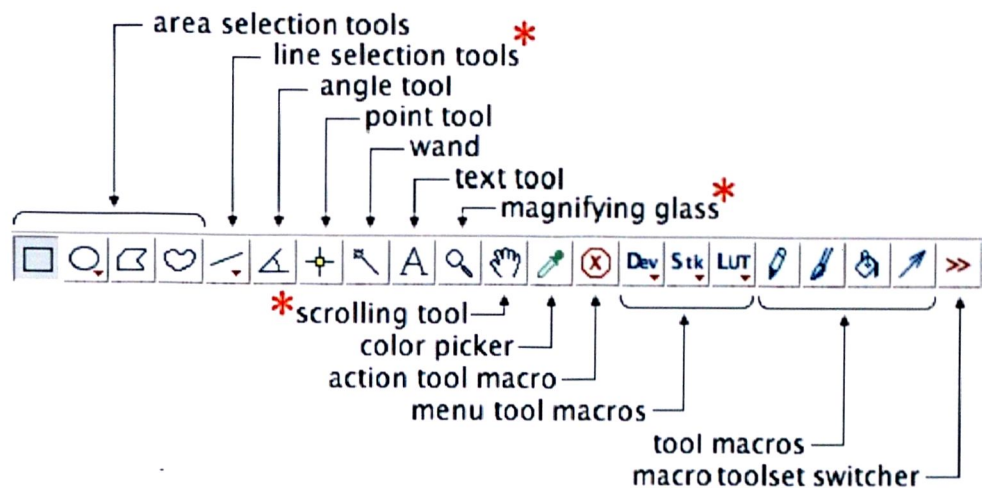


Obr. 3: Základní panel funkcí programu ImageJ

Mezi další funkce programu ImageJ patří schopnost měřit vzdálenosti a úhly, dále podporuje standardní funkce pro zpracování obrazu, jako jsou logické a aritmetické operace mezi obrázky, kontrast, manipulace, konvoluce, Fourierova analýza, ostření, vyhlazování, detekce hran. Dokáže podporovat libovolný počet obrázků současně, omezen je pouze dostupnou pamětí.

Pro účely mého měření byly důležité zejména funkce RGB merge pro sloučení obrázků, Color – adjust pro úpravu jasu a kontrastu, Magnifying glass pro přiblížení, Scrolling tool pro posun obrázku, Free handline selection pro označení měřených úseků a Analyze – measure pro změření jejich délky (obr. 4).

Mezi veřejností je ImageJ známý jako „vědecký software“ a jeho velkou výhodou, která vyplývá z volného přístupu ke zdrojovému kódu, je snadné přidání uživatelem vytvořených zásuvných modulů, pluginů. Pomocí těch lze řešit mnoho zobrazovacích úloh, od trojrozměrného zobrazení struktur na buněčné úrovni po zpracování obrazu pro radiologické účely a automatizované hematologické systémy (Rasband, 2009).



Obr. 4: Panel nástrojů s popisem funkcí, zvýrazněné funkce (*) byly použity při měření

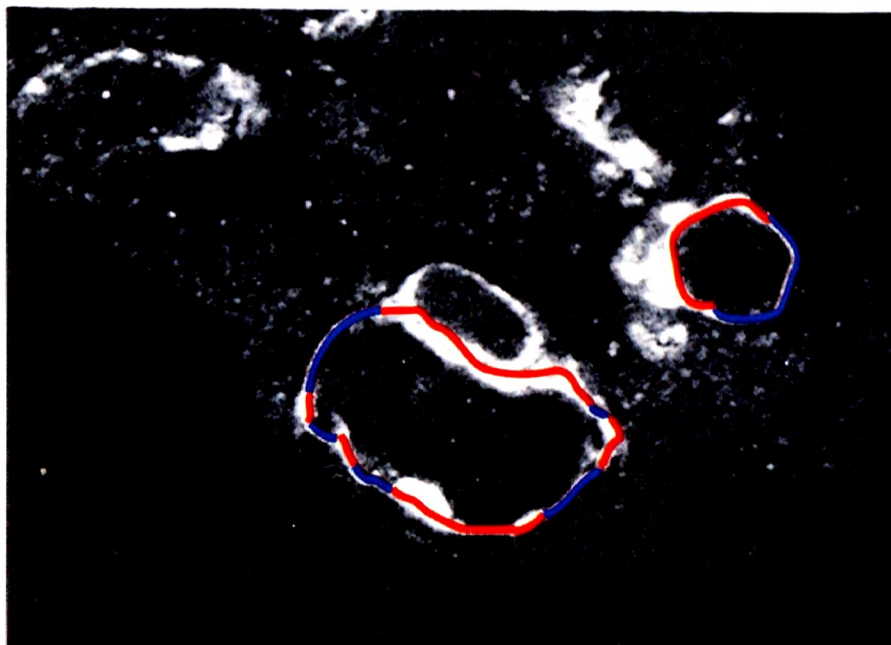
4.2 Postup měření

Příprava dat pro kvantitativní měření spočívala ve sloučení (funkce RGB merge) dvou datových souborů formátu TIFF. Tyto soubory nesly záznam signálů zachycených konfokálním mikroskopem při dvou výše zmíněných vlnových délkách – 405 nm a 532 nm. Signál zelené barvy, který odpovídal autofluorescenci, jsme pro lepší přehlednost do výsledného obrázku nezakomponovali.

Aby bylo dosaženo co nejvyšší nezaujatosti měření, byla pro výběr kapiláry k měření stanovena následující kritéria:

- Musela být umístěna v pravém horním kvadrantu zorného pole.
- Klk, ve kterém se kapilára nalézala, musel být bezpečně identifikován jako terminální.
- Kapilára musela být zobrazená celá a nepoškozená (vlivem krájení anebo umístěním na hranici zorného pole).
- Kapilára musela mít průřez kulatého či oválného tvaru, přičemž velká poloosa kapiláry nesměla být delší než dvojnásobek kratší poloosy.

Aby bylo možné přesně rozlišit, kde je a kde není pericytární pokryv, byla použita funkce přiblížení. Tím se daly přesně rozpoznat i velmi malé úseky, kde byl v kontaktu s kapilárním endotelem pouze tenký výběžek pericytu. Pomocí funkce Free handline selection bylo možné myší postupně označit SMA α pozitivní a negativní úseky obvodu kapilárního průřezu (obr. 5).



Obr. 5: SMA + (červeně) a SMA – (modře) úseky kapilárního obvodu

Funkce Analyse – measure změřila délku každého označeného úseku, hodnoty byly zaznamenány do tabulky. Aby nevznikla chyba, na začátku měření na jednotlivé kapiláře byl vždy změřen pozitivní úsek, takže všechny pozitivní úseky byly v pořadí liché, zatímco úseky negativní byly sudé. Hodnoty byly přeneseny do programu MS Office Excel. Součet hodnot na lichých řádcích dal celkovou délku SMA α + úseků kapiláry, součet hodnot na lichých a sudých řádcích se rovnal obvodu kapiláry. Podíl SMA α + úseků a součtu SMA α + a SMA α – úseků násobený stem byl relativní hodnotou pericytárního pokryvu kapiláry (viz vzorec).

$$Pokryv = \frac{SMA^+}{(SMA^+ + SMA^-)} * 100$$



Aby nedošlo ke zkreslení výsledků lidským faktorem, probíhala měření formou slepé zkoušky. Vzorky byly označeny posloupnými pracovními čísly a jejich rozdělení do skupin placent matek s diabetem (DM I.) a zdravých matek (kontrol) proběhlo až dodatečně při vyhodnocení výsledků a statistickém zpracování. Celkem bylo změřeno 1756 kapilár.

4.3 Statistické vyhodnocení

Stanovili jsme dvě hypotézy. Nulová hypotéza předpokládala, že rozdíly (hustota pericytárního pokryvu a podíl zcela SMA negativních kapilár v souboru) mezi kontrolní a diabetickou skupinou nejsou statisticky významné. Alternativní hypotéza naopak předpokládala statisticky významné rozdíly.

Pro doplnění jsme pak studovaný soubor placent matek s diabetem rozdělili na dvě skupiny definované hladinou glykovaného hemoglobinu, která slouží pro posouzení dosažené metabolické kompenzace diabetiček. Do první skupiny byly zařazeny ty, jejichž hladiny nebyly vyšší než 4,0 g/l, což odpovídá dobré kompenzaci. Druhá skupina obsahovala ty, jejichž hladiny glykovaného hemoglobinu byly vyšší, tedy úroveň kompenzace byla neuspokojivá.

Hodnoty pokryvu pericytů vyjádřených v procentech a poměru SMA α pozitivních a SMA α negativních kapilár v kontrolní a diabetické skupině a ve skupině dobře a špatně kompenzovaných diabetiček, jsme podrobili dvouvýběrovému nepárovém t-testu (Špunda et al., 2007). K provedení testů a konstrukci grafů jsem využil program MS Office Excel.

5. Výsledky

Výsledky naměřené v jednotlivých placentách byly rozděleny podle skupin a uspořádány do dvou následujících tabulek (tab. 1, tab. 2).

Vzorek	Počet měřených kapilár	Počet kapilár SMA α -	Podíl kapilár SMA α - (%)	Podíl SMA α + úseků (%)	Směrodatná odchylka
186	69	6	8,70	51,22	30,34
206	63	1	1,59	37,78	29,18
207	40	4	10,00	47,45	33,79
208	90	15	16,67	39,55	30,44
210	73	14	19,18	41,59	34,93
213	89	5	5,62	40,24	26,65
214	69	16	23,19	30,23	31,65
215	62	27	43,55	14,50	31,05

Tab. 1: Výsledky měření placent ve skupině zdravých matek

Vzorek	Počet měřených kapilár	Počet kapilár SMA α -	Podíl kapilár SMA α - (%)	Podíl SMA α + úseků (%)	Směrodatná odchylka
187	48	6	12,50	44,41	35,30
188	65	12	18,46	31,72	32,70
189	89	19	21,35	31,72	32,70
191	86	32	37,21	25,21	30,28
192	45	7	15,56	36,09	32,83
193	62	7	11,29	40,53	30,23
194	77	5	6,49	40,69	28,61
195	69	30	43,48	13,67	29,09
196	54	17	31,48	21,33	32,52
197	48	15	31,25	19,13	31,64
198	70	10	14,29	28,37	28,31
199	74	7	9,46	33,34	29,84
200	97	11	11,34	31,14	26,32
203	49	0	0	54,34	29,53
204	53	21	39,62	30,94	38,14
205	82	18	21,95	41,17	34,46
209	65	10	15,38	44,23	37,35
212	68	18	26,47	34,48	36,21

Tab. 2: Výsledky měření placent ve skupině matek s diabetes mellitus I. typu

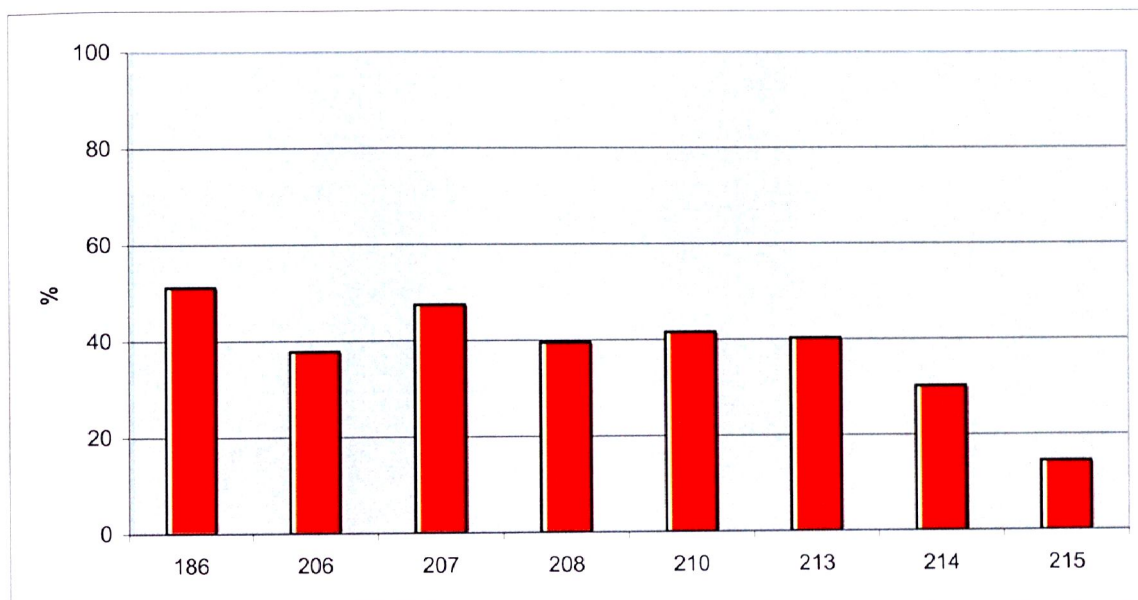
Průměrné hodnoty parametrů naměřených v obou skupinách placent jsou shrnuty v následující tabulce (tab. 3).

Vzorky	Počet měřených kapilár	Počet kapilár SMA α -	Podíl kapilár SMA α - (%)	Podíl SMA α + úseků (%)	Směrodatná odchylka
DM I.	1201	245	20,59	32,88	11,3
Kontr.	555	88	16,06	37,82	10,4

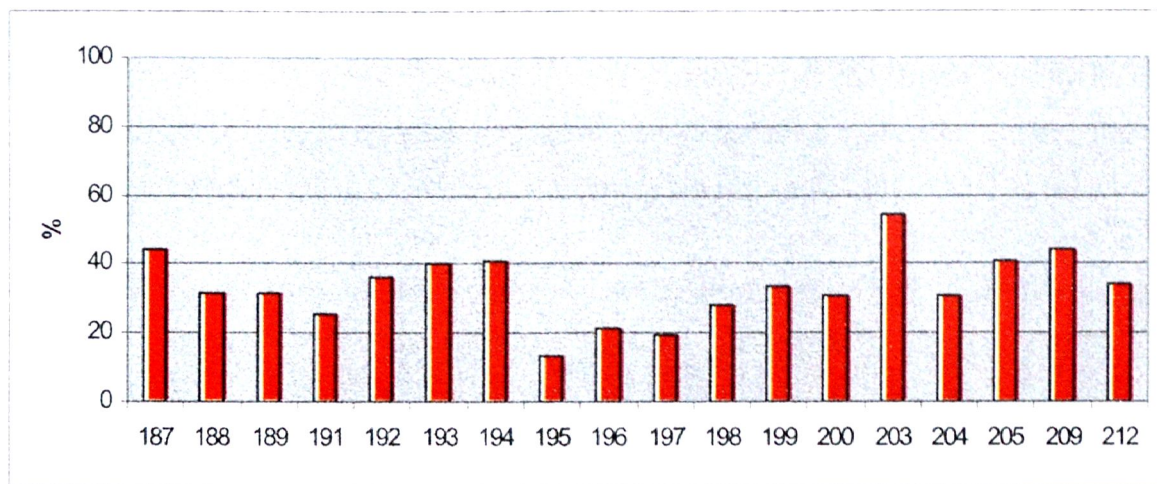
Tab. 3: Výsledky – porovnání placent matek s DM I. a kontrol

Významnost rozdílu mezi soubory byla otestována dvouvýběrovým nepárovým t -testem. Protože výsledek testu nebyl statisticky významný ($p > 0,05$), nepodařilo se potvrdit alternativní hypotézu, že hustota pericytárního pokryvu v placentě matek s diabetes mellitus I. typu a v placentě zdravých matek se liší. Stejně tak je tomu v podílu cév zcela SMA α negativních.

Přehledné grafické znázornění naměřených hodnot v placentách zdravých žen ukazuje, že pericyty svými těly a výběžky pokrývají kapiláry v rozsahu asi 15 až 52 % jejich obvodu (graf 1). Na druhém grafu, který znázorňuje totéž ve skupině diabetiček, je vidět, že minimální a maximální hodnoty jsou téměř shodné s hodnotami ve skupině zdravých žen (graf 2).

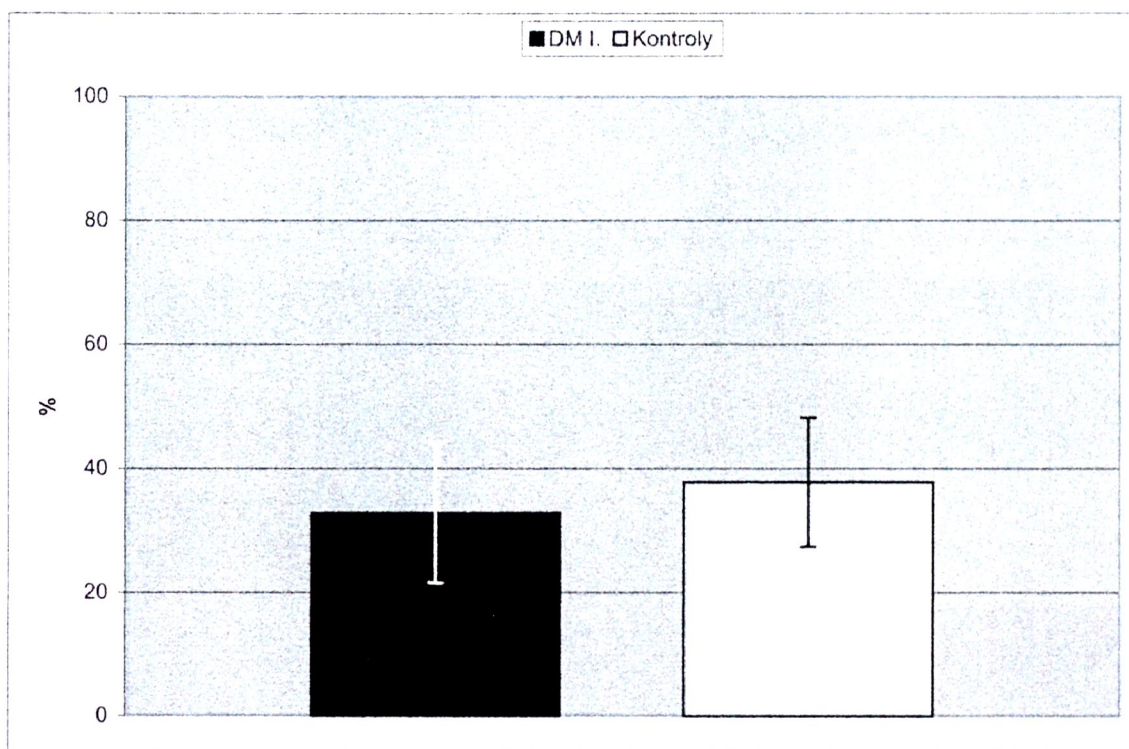


Graf 1: Relativní hodnota pericytárního pokryvu kapilární stěny ve skupině placent zdravých matek



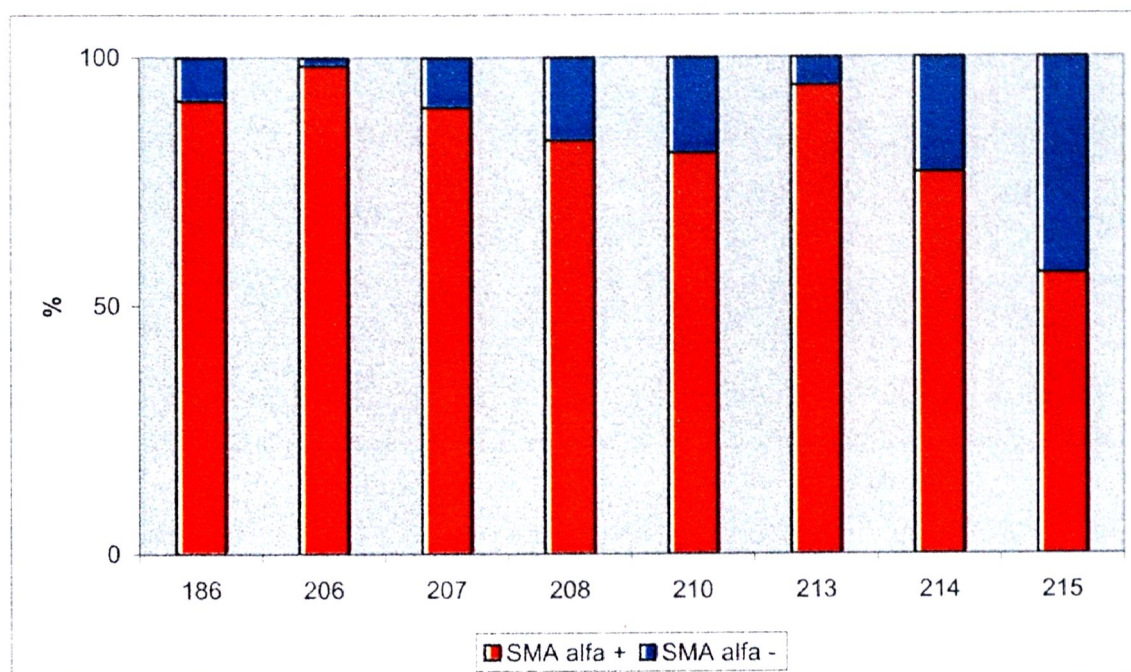
Graf 2: Relativní hodnota pericytárního pokryvu kapilární stěny ve skupině placent diabetiček

Následující graf porovnává celkové hodnoty získané ve skupině zdravých žen a diabetiček. Ukazuje, že rozdíly jsou nepatrné (graf 3).

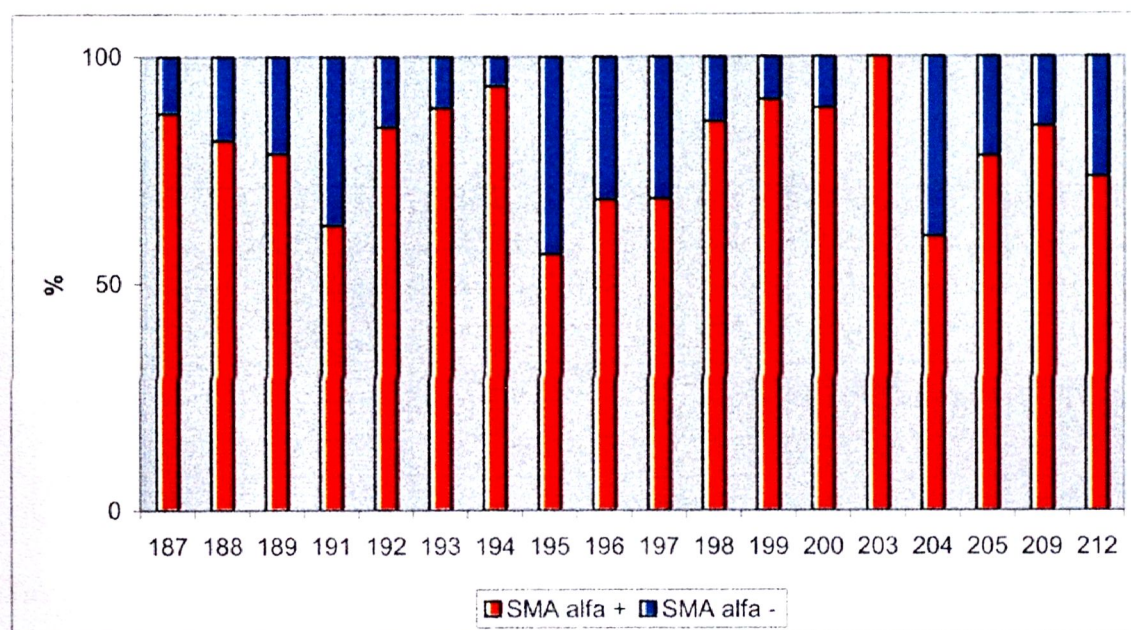


Graf 3: Přehledné znázornění výsledků dosažených v obou měřených skupinách

Druhým parametrem, který jsme stanovovali, byl podíl kapilár bez pericytárního pokryvu. Graf 4 znázorňuje hodnotu tohoto parametru v placentách zdravých žen, graf 5 znázorňuje hodnotu parametru v placentárních kapilárách diabetiček. Rozsah hodnot v kontrolních placentách (1,5 – 44 %) a v diabetických placentách (0 – 43 %) se nelišil.

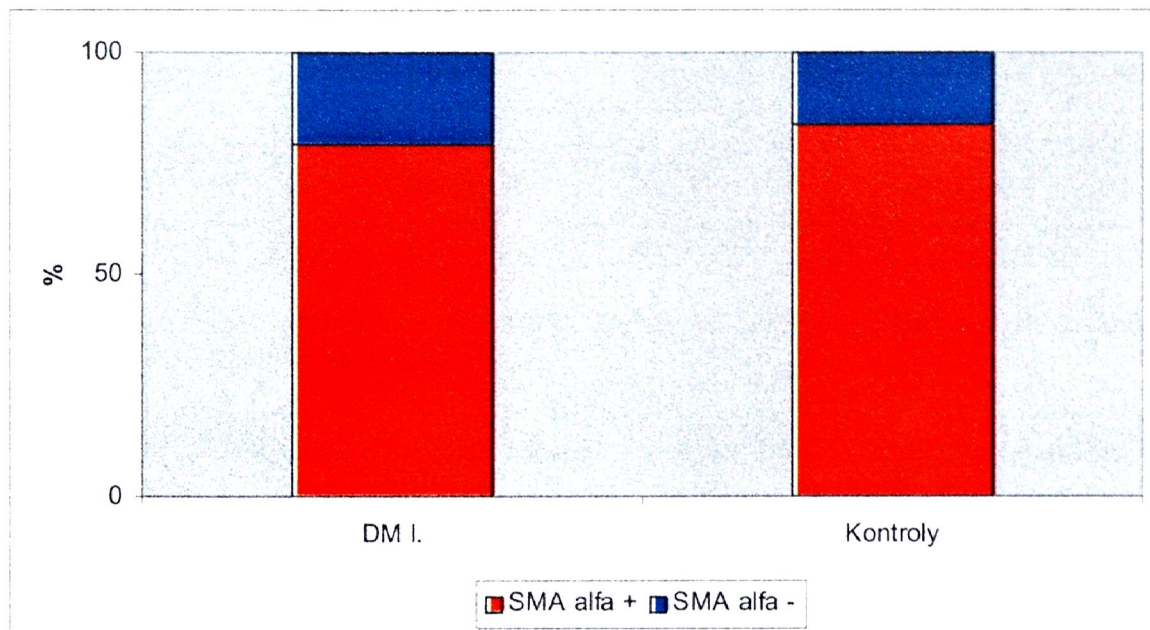


Graf 4: Podíl SMA alfa + kapilár a SMA alfa - kapilár v placentách zdravých žen



Graf 5: Podíl SMA alfa + kapilár a SMA alfa - kapilár v placentách diabetiček

Porovnání podílu SMA alfa + a SMA alfa – kapilár ve sledovaných skupinách ukazuje minimální rozdíl (graf 6).



Graf 6: Porovnání podílu SMA alfa + a SMA alfa – kapilár ve sledovaných skupinách placent diabetiček a zdravých matek

V následujících tabulkách (tab. 4 a tab. 5) jsou uvedené naměřené hodnoty u matek diabetiček podle kritéria naměřených hodnot glykovaného hemoglobinu.

Vzorek	Počet měřených kapilár	Počet kapilár SMA α -	Podíl kapilár SMA α - (%)	Podíl SMA α + úseků (%)	Směrodatná odchylka
188	65	12	18,46	31,72	32,70
189	89	19	21,35	31,72	32,70
192	45	7	15,56	36,09	32,83
193	62	7	11,29	40,53	30,23
194	77	5	6,49	40,69	28,61
200	97	11	11,34	31,14	26,32
205	82	18	21,95	41,17	34,46

Tab. 4: Naměřené hodnoty v placentách matek s hladinou glykovaného hemoglobinu v normě (do 4,0 g/l)

Vzorek	Počet měřených kapilár	Počet kapilár SMA α -	Podíl kapilár SMA α - (%)	Podíl SMA α + úseků (%)	Směrodatná odchylka
187	48	6	12,50	44,41	35,30
191	86	32	37,21	25,21	30,28
195	69	30	43,48	13,67	29,09
196	54	17	31,48	21,33	32,52
197	48	15	31,25	19,13	31,64
198	70	10	14,29	28,37	28,31
199	74	7	9,46	33,34	29,84
203	49	0	0	54,34	29,53
204	53	21	39,62	30,94	38,14
209	65	10	15,38	44,23	37,35
212	68	18	26,47	34,48	36,21

Tab. 5: Naměřené hodnoty v placentách matek se zvýšenou hladinou glykovaného hemoglobinu (nad 4,0 g/l)

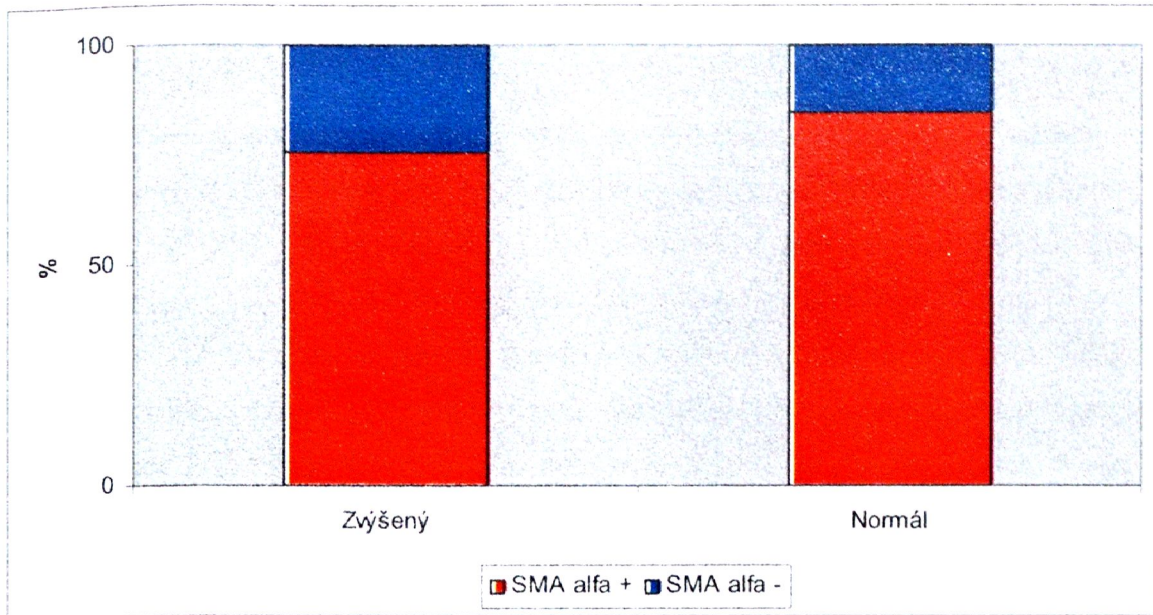
V této tabulce (tab. 6) jsou shrnuty výsledky porovnání hodnot naměřených v placentách diabetiček se zvýšenou hladinou glykovaného hemoglobinu a diabetiček s normální hladinou glykovaného hemoglobinu.

Vzorky	Počet měřených kapilár	Počet kapilár SMA α -	Podíl kapilár SMA α - (%)	Podíl SMA α + úseků (%)	Směrodatná odchylka
Normál	517	79	15,28	34,6	7,3
Zvýšený	684	166	24,27	31,8	12,19

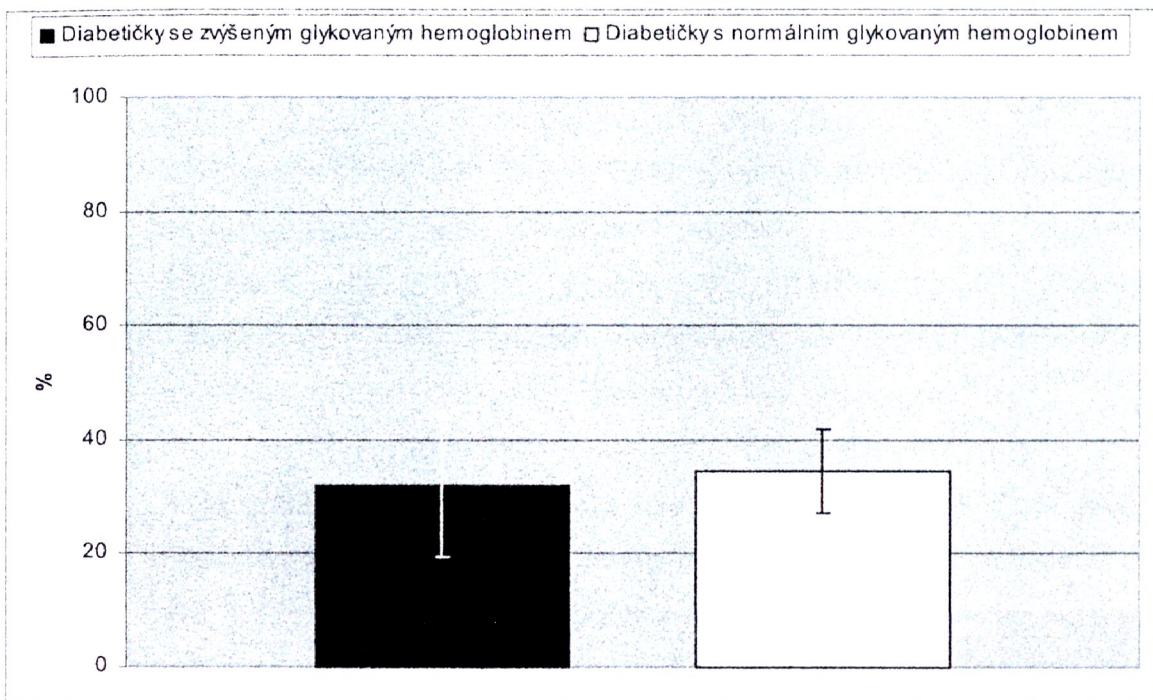
Tab. 6: Výsledky – porovnání hodnot pericytárního pokryvu vztahených k naměřené hladině glykovaného hemoglobinu

Při testování významnosti rozdílu mezi soubory diabetiček se zvýšenou hladinou glykovaného hemoglobinu a diabetiček s normální hladinou glykovaného hemoglobinu byla opět použit dvouvýběrový nepárový t-test. Jeho výsledek ukázal, že rozdíl není statisticky významný ($p > 0,05$).

Přehledné grafické znázornění (graf 7 a graf 8) naměřených hodnot v placentách dvou skupin diabetiček ukazuje, že rozdíly mezi oběma skupinami jsou zanedbatelné.



Graf 7: Porovnání podílu SMA alfa + a SMA alfa – kapilár ve sledovaných skupinách placent diabetiček s zvýšenou a normální hladinou glykovaného hemoglobinu



Graf 8: Přehledné znázornění výsledků dosažených v obou měřených skupinách diabetiček

6. Diskuze

Udržování homeostázy, stálosti vnitřního prostředí, spočívá mj. i v udržení stálé saturace krve kyslíkem, který je ke tkáním dopravován ve vazbě na hemoglobin. To je stejně nezbytné jak pro život po narození, tak i pro každého jedince během nitroděložního vývoje. Dojde – li ke snížení hladiny kyslíku v krvi, nastává hypoxie.

Tento stav, definovaný abnormálně nízkým objemem kyslíku dodaným za jednotku času k určitému místu v organismu, vede ke změně v zásobování tkání kyslíkem a k akutním i chronickým odpovědím na úrovni tkání i celého organismu. Projevy takovéto odpovědi je např. produkce růstových faktorů podporujících tvorbu erytrocytů a angiogenezi (erythropoetin, vaskulární endotelový růstový faktor – VEGF).

Zdravý vývoj jedince může být ohrožen hypoxií i během nitroděložního vývoje. Tato hypoxie nemá jedinou příčinu (Mayhew et al., 2004; Charnock-Jones et al., 2004). Současné poznání patofyziologie těhotenství rozlišuje tyto druhy těhotenských hypoxií:

- a) Preplacentární hypoxie. Může mít dvojí etiologii – jednak nedostatek kyslíku způsobený nízkou hladinou kyslíku ve vysokohorských podmínkách kde těhotná žije, nebo anemii matky způsobenou např. nedostatkem železa.
- b) Uteroplacentární hypoxie. Její příčinou je vasokonstrikce cév zásobujících intervilózní prostor, která je spojena s takovými stavy, jako je hypertenze onemocnění matky nebo preeklampsie charakterizovaná proteinurií a hypertenzí. Tyto zdravotní komplikace na straně matky vedou k nedostatečnému zásobení intervilózního prostoru okysličenou krví.
- c) Postplacentární hypoxie. Také se jí říká „placentární hyperoxie“. Je spojena se sníženou extrakcí kyslíku do krevního oběhu plodu z intervilózního prostoru, která nastává tehdy, když je fetoplacentární cévní řečiště méně rozvinuté např. při deficienci terminálních klků. Hladina kyslíku v prostoru mezi placentárními klky ovšem není zvýšena nad obvyklou hodnotu.
- d) Hypoxie spojená s diabetem. Zvýšená nabídka glukózy v mateřské krvi způsobí hyperglykémii plodu, který na ní reaguje např. zvýšenou sekrecí inzulínu.

Metabolismus glukózy vyžaduje dostatečný přísun kyslíku. Pokud toto není zajištěno, strádá plod hypoxií. To se projeví např. zvýšeným hematokritem a vyššími hladinami hemoglobinu a erythropoetinu. V placentě se pak diabetes matky projevuje zvýšenou angiogenezi (Jirkovská et al., 2002).

Jak již bylo řečeno, pericyty spoluvytvářejí kapilární stěnu, jsou významným činitelem její stabilizace, regulují tonus kapilární stěny a podílejí se na udržování lokální tkáňové homeostázy. Zároveň jsou transportním prostředím a podílejí se na syntéze složek mezibuněčné hmoty. K jejich funkcím patří i řízení klidových fází cév a hrají rovněž významnou úlohu v angiogenezi, proto jsou v současné době intenzivně zkoumány. Během angiogeneze ztrácejí své výběžky a také těsný vztah k endotelovým buňkám. Jejich proliferace a migrace je předpokladem pro dobudování normální struktury nově vytvořených kapilárních segmentů (Díaz - Flores, 2009). Zde se uplatňuje plasticita těchto buněk a jejím důsledkem je např. i to, že ve vysokých nadmořských výškách vytvářejí řídkší povrch endotelových buněk kapilár, což sníží průměrnou tloušťku transportní bariéry a usnadní přestup kyslíku do fetální krve (Zhang et al., 2002).

V procesu patologické angiogeneze, a to zejména při vzniku cévního řečiště v nádorech, se kapilární pericyty chovají mnohdy odlišně. Mohou se vyznačovat zvláštním tvarem, zvláště pak bizarními cytoplasmatickými výběžky, kterými pronikají hluboko do endotelu. Pericyty přiléhají ke kapilárám v nádorových tkáních těsněji, nežli je tomu v jiných tkáních lidského těla. Rovněž byly pozorovány případy, kdy pericyty na různých kapilárních segmentech vytvořily mezi sebou můstky pomocí svých výběžků, kterými pronikly hluboko do nádorového parenchymu. V nádorové tkáni dokonce dochází k vzájemnému překryvu pericytů, což v normálních – fyziologických tkáních nebylo dosud zaznamenáno (Morikawa et al., 2002).

Hustota pericytárního povrchu na zevní straně kapiláry je další důležitý parametr, který má vliv na vlastnosti kapiláry jako takové. Kvantifikace tohoto parametru je však pracná a časově náročná, proto neexistuje mnoho prací věnovaných pericytům, které by obsahovaly kvantitativní údaje. V dosud publikovaných pracích na toto téma použili autoři dva metodické přístupy. První metoda se vyznačovala tím, že protilátkou značené pericyty na kapilárních průřezích byly hodnoceny podle kritéria

„je přítomen – není přítomen“, vyhodnocením byl získán tzv. „pericyte coverage index“. Druhý přístup spočíval v tom, že délka pericytárního pokryvu byla změřena a vyjádřena jako podíl na obvodu kapilárního průřezu.

Jak zjistili Zhang a spoluautoři (2002), placenta ve vysokohorských podmínkách, které navozují preplacentární hypoxii, reaguje tak, že kapilární endotel je z vnější strany pokryt méně hustou sítí pericytů a jejich výběžků. Autoři ve své studii na placentě zvolili stanovení pericyte coverage indexu, které aplikoval i Eberhard et al. (2000) na několika typech nádorů. Morikawova práce (Morikawa et al., 2002) využívá obojího přístupu, tj. jak stanovení pericyte coverage indexu, tak i změření podílu kapilárního obvodu pokrytého pericyty.

V této práci jsem pro úplnost a možné porovnání pericytární pokryv kapilár ve vzorcích placent kvantifikoval oběma způsoby a to tak, že jsem nejprve změřil podíl pericytárního pokryvu na kapilárách a podle získaných hodnot je rozdělil do dvou skupin, SMA $\alpha +$ a SMA $\alpha -$. Významnost rozdílu mezi soubory (kontrolním a diabetickým) rozdělenými podle těchto parametrů byla statisticky otestována. Oba metodické přístupy prokázaly, že rozdíly v pericytárním pokryvu kapilár placent zdravých matek a diabetiček nejsou statisticky významné. Podobně jsem otestoval i významnost rozdílů uvnitř diabetické skupiny rozdělené podle kritéria hladiny glykovaného hemoglobinu.

Tato studie je zcela první, která kvantitativně srovnává pericytární pokryv kapilár v placentě zdravých žen a diabetiček. Výsledky, ke kterým dospěla, ukázaly, že rozdíl mezi hustotou pericytárního pokryvu placentárních kapilár zdravých matek a diabetiček je minimální. Rovněž rozdíl pericytárního pokryvu placentárních kapilár mezi skupinou matek s normální hladinou glykovaného hemoglobinu, u nichž je dosažena dobrá kompenzace diabetu a plod není ohrožen hypoxií, a skupinou matek, které měly hladiny glykovaného hemoglobinu zvýšenou, tedy nedosahovaly optimální metabolické kompenzace a jejich plody byly více ohroženy hypoxií, nebyl statisticky významný. To svědčí o tom, že preplacentární hypoxie vznikající ve vysokohorských podmínkách není stav srovnatelný s tím, který může nastat při onemocnění matky diabetem.

7. Závěr

Tato práce si dala za úkol najít odpověď na otázku, zda dochází v placentárních kapilárách ke změně rozsahu pericytárního pokryvu v případech, kdy je těhotenství komplikováno matčíným diabetem.

Ukázalo se, že míra pericytárního pokryvu kapilár mezi dvěma sledovanými skupinami, placentami zdravých matek a matek – diabetiček se neliší. Rovněž se ukázalo, že úroveň kompenzace matčina diabetu odvozená od naměřených hodnot glykovaného hemoglobinu neovlivňuje rozsah pericytárního pokryvu kapilár.

Věřím, že tato práce je přínosem k poznání projevů reakce placentárního cévního řečiště na diabetes matky.

8. Literatura

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P. *Pathology of the human placenta*. 4rd edition. New York (USA) : Springer - Verlag, 2000. 921 s. ISBN 0-387-98894-7.

CHALLIER, J.C.; GALTIER, M.; KACEMI, A.; GUILLAUMIN, D. *Pericytes of term human foeto-placental microvessels: ultrastructure and visualization*. Cellular and molecular biology. 1999, 45, s. 89-100.

CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M. *Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis I. Molecular regulation*. Placenta. 2004, 25, s. 103-113.

DÍAZ-FLORES, L.; GUTIÉRREZ, R.; MADRID, J. F.; VALERA H.; VALLADARES, F.; ACOSTA, E.; MARTÍN-VASALLO, P.; DÍAZ-FLORES, L. Jr. *Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche*. Histology and Histopathology. 2009, 24, s. 909-969.

EBERHARD, A.; KAHLERT, S.; GOEDE, V.; HAMMERLEIN, B.; PLATE, K. H.; AUGUSTIN, H. G. *Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies*. Cancer research. 2000, 60, s. 1388-1393.

ELIŠKOVÁ, M.; NAŇKA, O. *Přehled anatomie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2006. 310 s. ISBN 80-246-1216-X.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Color textbook of histology*. 2nd edition. United States of America : W. B. Saunders Copany A Harcourt Health Sciences Company, 2001. 577 s. ISBN 0-7216-8806-3.

HÁJEK, Z. a kolektiv. *Rizikové a patologické těhotenství*. 1. vydání. Praha : Grada, 2004. 444 s. ISBN 80-247-0418-8.

JIRKOVSKÁ, M.; JANÁČEK, J.; KALÁB, J.; KUBÍNOVÁ, L. *Three-dimensional arrangement of the capillary bed and its relationship to microrheology in the terminal villi of normal term placenta*. *Placenta*. 2008, 29, s. 892-897.

JIRKOVSKÁ, M.; KUBÍNOVÁ, L.; JANÁČEK, J.; MORAVCOVÁ, M.; KREJČÍ, V.; KAREN, P. *Topological properties and spatial organization of villous capillaries in normal and diabetic placentas*. *J Vasc Res*. 2002, 39, s. 268-78.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.; KELLEY, J. *Základy histologie*. 7. vydání. Jinočany : H & H, 1997. 502 s. ISBN 80-85787-37-7.

MAYHEW, T. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P. *Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies*. *Placenta*. 2004, 25, s. 127-139.

MORIKAWA, S.; BALUK, P.; KAIDOH, T.; HASKELL, A.; JAIN, R. K.; MCDONALD, M. D. *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. *American Journal of Pathology*. 2002, 160, s. 985-1000.

RASBAND, W. S. *ImageJ* [online]. Maryland (USA) : U. S. National Institutes of Health, Bethesda, 1997-2009 [cit. 2010-02-27]. Dostupné z WWW: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>.

ŠPUNDA, M.; DUŠEK, J. *Zdravotnická informatika*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2007. 194 s. ISBN 978-80-246-1378-9.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. *Wheater's functional histology : a text and colour atlas*. 4th edition. Edinburgh : Churchill Livingstone, 2000. 413 s. ISBN 0-443-05618-8.

ZHANG, E. G.; BURTON, G. J.; SMITH, S. K.; CHARNOCK-JONES, D. S. *Placental vessel adaptation during gestation and to high altitude: changes in diameter and perivascular cell coverage*. *Placenta*. 2002, 23, s. 751-762.